

Untersuchungen
zum Nachweis von E 605

von

GERTRAUD FEIERTAG

Aus dem Institut für gerichtliche Medizin
und Kriminalistik der Universität Erlangen
Direktor: Professor Dr.Dr. E.Weinig

Untersuchungen zum Nachweis von E 605

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Friedrich-Alexander-Universität
zu
Erlangen



Vorgelegt von
Gertraud Feiertag
aus Ammerndorf

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen Fakultät
der Universität Erlangen.

Dekan : Professor Dr. med. C. K o r t h

Referent: Professor Dr. med. et phil. E. W e i n i g

Tag der mündlichen Prüfung: 18.7.1957

Meinen Eltern gewidmet
in Dankbarkeit.

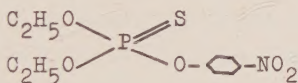
Disposition

	Seite:
A. Einleitung	1
I. Allgemeines über E 605	1
II. Nachweismethoden	2
B. Eigene Untersuchungen	5
I. Über die angewandten Methoden	6
1.) Spektrophotometrische Messung	6
2.) Reaktion nach Averell und Norris	7
3.) Alkalikochprobe	9
4.) Indophenolblaureaktion	10
II. Vorversuche	11
III. Hauptversuchsreihe	22
1.) Anordnung und Durchführung der Hauptversuchsreihe	22
2.) Reinigung	23
3.) Ergebnisse der spektrophotometri- schen Messungen	24
Filtrate	24
Destillate	24
Zur Auswertung wichtige Voraus- setzungen	27
Auswertung der Filtratkurven	28
Auswertung der Destillatkurven	29
4.) Ergebnisse der Reaktion nach Averell und Norris	31
Reduzierte Proben	31
Nicht reduzierte Proben	34
Auswertung	35
5.) Ergebnisse der Alkalikochprobe	36
Filtrate	36
Destillate	37
C. Zusammenfassung	38
I. Ergebnis der Vorversuche	38
II. Ergebnis der Hauptversuchsreihe	39
D. Literaturverzeichnis	41
E. Lebenslauf	44

A. EINLEITUNG.

I. Allgemeines über E 605.

Das Insektizid E 605 wurde 1944 von Gerhard Schrader in den Laboratorien der ehemaligen I.G.-Farbenindustrie entwickelt. Es stellt ein hochwirksames Kontaktinsektizid und Fraßgift dar, das fast alle Insekten angreift. Chemisch gesehen ist es ein O,O-Diäthyl-O,p-nitrophenyl-thiophosphorsäureester:



Nach Schrader stellt die Substanz in reinster Form eine schwach gelb gefärbte Flüssigkeit dar, die bei plus 6° erstarrt. Ihr Siedepunkt liegt bei einem Druck von 0,6 mm Hg bei 157-162°. Die Löslichkeit in Wasser bei Zimmertemperatur ist gering, sie wird mit 1 : 50 000 angegeben. Leicht löslich ist es dagegen in Methanol, Äthanol, Aceton, Äther und Chloroform, nur wenig löslich aber in Petroläther (Vogt).

Das technische Produkt E 605 forte ist eine braunrote Flüssigkeit mit charakteristischem, knoblauchähnlichem Geruch, dessen Siedepunkt bei einem Druck von 1 mm Hg bei 160-162° liegt. Der Wirkstoff ist dabei mit einer Trägersubstanz (Emulgator) vermisch (Vogel), um die Löslichkeit in Wasser zu bessern; sie beträgt dann etwa 1 : 20 000 (Schrader).

In Deutschland ist das Präparat in verschiedenen Konzentrationen im Handel (Quecke):

als E 605 forte, 50%ig

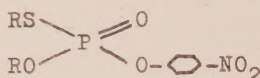
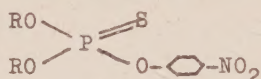
als E 605 Staub,

als POX-Borchers-Präparate (mit gleichem Wirkstoff, aber anderem Emulgator).

Nach Schrader ist E 605 in wässriger Lösung bei Zimmertemperatur und bei p_{H} -Werten zwischen 4 und 8 weitgehend beständig, dagegen wird es bei p_{H} -Werten zwischen 9 und 11 ziemlich rasch zerstört. Nach Vogt nimmt die Beständigkeit bei p_{H} -Werten über 11 und sonst unveränderten Bedingungen wieder zu.

Durch Einwirkung von Natronlauge bei Temperaturen zwischen 10

und 75° C tritt eine Spaltung des Moleküls ein (Ketelaer, zit. bei Vogt; vgl. auch Kap. I,3). Schrader weist auch darauf hin, daß E 605, ähnlich wie es Emett und Jones für Trimethylthio-phosphat beschrieben haben, bei höheren Temperaturen Neigung zu Umlagerungen zeigt:



Nach Schrader tritt diese Isomerisation bei einer Temperatur von 140° quantitativ ein.

Hinsichtlich der toxischen Wirkung wird auf die einschlägige Literatur verwiesen, in der sowohl die Angriffspunkte des Giftes im menschlichen Körper, die daraus resultierenden Symptome und pathologischen Befunde, als auch die Therapie und Erfahrungen beim Nachweis dargelegt sind. Solche Angaben finden sich u.a. bei Vogel, Leonhardt, ferner bei Hagen und Reinl, Taschen und Wirriger, bei Jantzen, Lehmann und Quecke, neuerdings auch bei Pribilla und Duspiva.¹⁾

II. Nachweismethoden.

Bis zum Jahre 1954 sind nur einige gewerbliche Vergiftungsfälle, sowie wenige Selbstmorde mit E 605 beschrieben worden. Als Mordmittel spielte es bis dahin keine Rolle. Erst 1954 wurde es durch unverantwortliche Pressemeldungen über drei Giftmorde schlagartig bekannt. Da dieses Insektizid außerdem ohne Giftschein im Handel zu erhalten ist, wurde es sozusagen zum Modegift. Insbesondere vorsätzliche Vergiftungen mit E 605 nahmen rasch zu, so daß das Interesse vor allem der gerichtsmedizinischen Institute an geeigneten Nachweismethoden für dieses Mittel verständlich ist.

1) Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden in der Zeit zwischen 1.8.54 und 31.10.54 bei Berücksichtigung der damals vorhandenen Literatur durchgeführt. Von den später erschienenen Veröffentlichungen wurden bei der Überarbeitung vor allem die von Weinig, Schmitt u. Schmidt, Kaiser u. Haag, Pribilla, Paulus u. Mallach, Paulus, Mallach u. Janitzki, Derkosch u. Mitarb., Fretwurst u. Naeve berücksichtigt.

Heute übliche Nachweismethoden sind:

a) Methode nach Averell und Norris:

Sie war ursprünglich zum Nachweis von Sprüh- oder Staubrückenständen auf Früchten und Pflanzen gedacht, in den letzten Jahren wurde sie jedoch auch in mehreren Modifikationen (Kaiser, Pfeil, Fretwurst u.a.) zum Nachweis einer E 605-Vergiftung in Leichenteilen und Körperflüssigkeiten herangezogen; Kaiser u.Lang benutzten sie zum Nachweis im Blut. Neuerdings fand man aber, wie in Kap. B I/2 näher dargelegt ist, Leerwerte sowohl in gefaultem Leichenmaterial als auch anderen toxikologisch interessierenden Substanzen (Kaiser u.Haag, Fretwurst u.Naëve). Nach Weinig u.Mitarb. kommt deshalb der Averell u.Norris-Reaktion als Beweismittel beim E 605-Nachweis nur noch eine sehr beschränkte Bedeutung zu. Wegen ihrer Empfindlichkeit kann sie jedoch einen großen Wert für den Ausschluß einer E 605-Vergiftung haben.

b) Alkalikochprobe, Reaktion nach Ketelaer u.Hellingman:

(Vgl. Kap. B I/3). Sie ist nicht ganz so empfindlich wie die Reaktion nach Averell u.Norris und ebenfalls nicht spezifisch. Diese Reaktion bildet die Grundlage für das Schnellverfahren zum Nachweis im Blut nach Schwerd und Schmidt, außerdem für den Nachweis aus dem Mageninhalt nach Völksen und für das Verfahren von Schönamsgruber, wobei außer p-Nitrophenol noch die stabile Säurekomponente von E 605 erhalten wird.

c) Indophenolblaureaktion, schon 1912 von Ullmann u.Graedinger beschrieben:

Sie zeigt das reduzierte Spaltprodukt von E 605 und andere Aminophenole an (vgl. Kap. B I/4). Dropmann benutzt sie zum Nachweis in Organextrakten, Sigrid v.Eicken zum Nachweis im Harn - neuerdings modifiziert von Weinig.

d) Quantitative Schwefelbestimmung nach Dropmann:

Es wird dabei der Schwefel des E 605-Moleküls quantitativ in Sulfatschwefel übergeführt und dieser anschließend gravimetrisch oder titrimetrisch bestimmt.

e) Papierchromatographie nach Pfeil u.Goldbach:

Schmidt benützt diese Methode ohne das Molekül vorher durch Kochen mit Natronlauge zu spalten; bei der Wanderung in ammoniakalischem Milieu erfolgt das teilweise von selbst, so

daß sowohl p-Nitrophenol als auch das ungespaltene E 605-Molekül getrennt nachgewiesen werden können. In neuerer Zeit konnten Kaiser u. Haag mit ihrer Modifikation sowohl E 605, sein Spaltprodukt p-Nitrophenol, als auch den Emulgator des Handelspräparates E 605 forte auf einem Chromatogramm feststellen. Metcalf u. March haben eine Methode zur Papierchromatographie entwickelt, die es gestattet, das S-Phenyl- und das S-Äthyl-Isomere des E 605 und seine schwefelfreie Substanz E 600 nebeneinander zu bestimmen.

- f) Chromatographische Trennung von Farbstoffen mittels Aluminiumoxyd nach Pfeil:

Es wird dabei das in der Lösung vorhandene E 605 getrennt von den anderen Farbstoffen als gelber Ring am oberen Rand einer Absorptionssäule sichtbar. Anschließend erfolgt die Bestimmung dieser eluierten gelben Zone nach Averell u. Norris.

- g) Nachweis des Emulgators nach Völksen:

Durch Unterschichtung mit konzentrierter Schwefelsäure entsteht bei E 605-haltigen Lösungen eine zuerst blau-grüne Verfärbung, die sich später in Ultramarinblau umwandelt. Diese Methode, die bei E 605 forte in einer Verdünnung von 1:1000 noch positiv ausfällt, eignet sich zum Nachweis im Mageninhalt.

- h) Bestimmung der Cholinesteraseaktivität im Serum und in den Erythrocyten nach Wirth:

Dieser Nachweis beruht auf der Fähigkeit des E 605, die Blut- und Gewebscholinesterase zu hemmen. Homann weist die Cholinesterasehemmung papierchromatographisch nach. Wie aus der zusammenfassenden Schrift von Quecke hervorgeht, ist dieser Nachweis aber nicht spezifisch, da auch andere Stoffe, wie Strychnin, Chinin, Histamin, Eserin, Prostigmin, Methylenblau, die Anästhetika der Cocainreihe, Narkotika und Alkohol in höheren Dosen die Cholinesteraseaktivität hemmen.

- i) Biologisches Verfahren nach Völksen:

Dabei wird die kontaktinsektizide Wirkung des E 605-haltigen Mageninhalts bei Asseln erprobt.

- k) Isolierung von p-Nitrophenol nach Breinlich:

Das aus dem Mageninhalt isolierte p-Nitrophenol wird durch Bestimmung seines Schmelzpunktes charakterisiert.

1) Rhodamin-B-Probe nach Feigl:

Sie ist spezifisch für p-Nitrophenol (Derkosch u.Mitarb.). Bei positivem Ausfall tritt eine orangerote U.V.-Fluoreszenz auf, die jedoch nur verwertbar ist, wenn das zur Probe verwendete Benzol völlig trocken war.

B. EIGENE UNTERSUCHUNGEN.

Aus dem vorhergehenden Kapitel geht hervor, daß die heute üblichen Nachweismethoden keineswegs spezifisch sind für das E 605-Molekül, ja nicht einmal für dessen Spaltprodukte. Andere Methoden wiederum, wie beispielsweise die Papierchromatographie, sind zu wenig empfindlich. Auf der Suche nach einem Nachweis, der diese fehlenden Eigenschaften aufweist, hat sich die spektrophotometrische Untersuchungsmethode angeboten, die außerdem auch eventuell vorhandene Veränderungen des E 605-Moleküls anzeigen würde. In unserem Institut wurden diesbezüglich Versuche durchgeführt, die eine Absorption dieses Moleküls im Ultraviolettbereich erkennen ließen, wie übrigens auch schon Schrader erwähnt hat.¹⁾ Es ist wichtig, zwischen Versuchen mit Reinsubstanz und solchen an Organmaterial zu unterscheiden. Bei letzteren sind nicht nur die Umwandlungsprozesse im Stoffwechsel zu berücksichtigen, sondern auch Veränderungen bei Leichenfäulnis. Da besonders dringendes Bedürfnis nach sicheren Nachweismethoden bei der Leiche besteht, haben wir nach einleitenden Versuchen mit verschiedenen Testsubstanzen faulendes Leichenmaterial in verdünnter Lösung nach Homogenisierung untersucht, dem E 605-Mengen zugesetzt worden waren. Zahlreiche Versuche an unserem Institut mit der Wasserdampfdestillation (Schmidt, Hartig) ergaben, daß E 605 (wie auch Vogel schon erwähnte) destillierbar ist. In weiteren Untersuchungen wurde aber auch die Beobachtung gemacht, daß es bei direkter, einfacher Destillation in gleicher Weise flüchtig ist und daß die Wasserdampfdestillation lediglich den

1) Inzwischen sind bereits Veröffentlichungen von Derkosch, Jansch, Leutner und Mayer erschienen, ferner von Fretwurst und Naeve, die sich ebenfalls mit der UV- und teilweise auch mit der Ultrarot-Absorption des E 605-Moleküls befassen.

Vorteil hat, daß

- 1) auch bei starkem Erhitzen der Untersuchungslösung eine thermische Zersetzung organischer Substanzen vermieden wird, und daß
- 2) beliebig große Destillatmengen übergetrieben werden können.

Da in der vorliegenden Arbeit ausschließlich mit bereits stark verdünnten wässrigen Lösungen gearbeitet wird, genügte für diese Zwecke die einfache Destillation.

I. Über die angewandten Methoden.

1.) Spektrophotometrische Messung.

Wir haben für die folgenden Messungen das "Zeiß Opton Spefo" benutzt, ein Spektralphotometer mit Monochromator M4Q (Ausrüstung mit Quarzoptik). Die benutzten Quarzküvetten haben eine Schichtdicke von 2 cm. An der Skala kann direkt die Extinktion abgelesen werden; man versteht unter der Extinktion E den Logarithmus der reziproken Durchlässigkeit; formelmäßig ausgedrückt:

$$E_{\lambda} = \log \frac{1}{D} = \log \frac{\varnothing_0}{\varnothing}$$

D = die Durchlässigkeit

$\varnothing_0$ = der eintretende Lichtstrom

$\varnothing$ = der austretende Lichtstrom

Dabei bedeutet der Zusatz λ , daß die Größe der Extinktion von der Wellenlänge des Lichtes abhängig ist; beträgt z.B.:

$$D = 100\%, \text{ dann ist } E = \log 100/100 = \log 1 = 0$$

$$D = 10 \%, \text{ dann ist } E = \log 10 = 1$$

$$D = 1 \%, \text{ dann ist } E = \log 100 = 2$$

$$D = 0 \%, \text{ dann ist } E = \log \infty = \infty$$

Um die größte Genauigkeit des Meßbereichs zu erzielen, wurden die Konzentrationen möglichst so gewählt, daß die Extinktionswerte zwischen 1,0 und 0,1 blieben, bzw. die Durchlässigkeit zwischen 10% und nahe 100% lag. Der Verlauf der Extinktionskurve, d.h. Höhe und Steilheit ist bedingt durch die Anzahl der absorbierenden Moleküle, also durch Konzentration und Schichtdicke, denn nach dem Lambert-Beerschen Gesetz gilt:

$$E_{\lambda} = c \cdot s \cdot \epsilon_{\lambda}$$

Dabei bedeutet c die Konzentration in Mol/l, s die vom Lichtstrahl durchlaufene Schichtdicke der Lösung in cm und ϵ den Extinktionskoeffizienten. Bei monochromatischem Licht und konstanten äußeren Meßbedingungen wie Druck und Temperatur, ist der Extinktionskoeffizient eine konzentrationsunabhängige Stoffkonstante.

2.) Reaktion nach Averell und Norris.

Das Verfahren dient zum Nachweis von E 605, ist aber nicht spezifisch für diesen Stoff. Aus dem neueren Schrifttum geht hervor, daß außer E 605 nicht nur alle aromatischen Nitrokörper nach Reduktion und primären aromatischen Amine ohne Reduktion ähnliche Farbstoffe bilden können, sondern auch völlig anders gebaute Stoffe. Weinig, Schmitt und Schmidt untersuchten 90 Substanzen, die toxikologisch von Bedeutung sein können und den verschiedensten chemischen Stoffklassen angehören. Davon wurden 26 ermittelt, die mit und ohne Reduktion nach 30 Minuten positiv reagierten, 6 Substanzen waren in bestimmten Konzentrationsbereichen ohne Reduktion negativ und mit Reduktion positiv. Paulus und Mallach führten mit 10 Barbituraten die Averell und Norris-Reaktion durch und bekamen in 8 Fällen positive Ausfälle, allerdings bei relativ hohen Dosen. Dieselben Autoren stellten fest, daß fast alle handelsüblichen Sulfonamide den Diazo-Nachweis von E 605 stören. Paulus, Mallach und Janitzki fanden ferner positiven Ausfall der Reaktion bei Supracillin, Kaiser und Lang bei Chloromycetin und Leucomycin.

Der Vorgang ist folgender: die Nitrogruppe im E 605-Molekül wird mit Zinkstaub und Salzsäure zur Aminogruppe reduziert. Der entstandene Aminoester wird durch Nitritzusatz diazotiert (nach Bratton und Marshall), der Überschuß an NO_2 -Ionen mit Amidosulfonsäure gebunden, und das Diazotierungsprodukt mit N-(1-Naphthyl-)Äthylendiamin-Dihydrochlorid zu einem rotvioletten Farbstoff gekuppelt.

Reagenzien:

- 1) 0,25%iges Natrium-Nitrit
- 2) 2,5 %ige Amidosulfonsäure
- 3) 1,0 %iges N-(1-Naphthyl-)Äthylendiamin-Dihydrochlorid.

Durchführung der Reaktion:

20 ccm der zu untersuchenden Lösung wurden im Becherglas mit 2 ccm einer 5n HCl und einer Messerspitze (0,2 g) Zinkpulver versetzt, mit einem Uhrglas abgedeckt und zur Reduktion 5 Minuten lang gekocht. Das Zink wurde abfiltriert und die Flüssigkeit wieder auf 20 ccm aufgefüllt mit Aqua dest. (Zur quantitativen Auswertung wird das Becherglas, die untere Seite des Uhrglases und das Filter mehrmals mit Aqua dest. nachgespült). Anschließend kamen die Proben bis zur völligen Abkühlung in den Eisschrank, dort wurde auch der Diazotierungs- und Kupplungsvorgang durchgeführt. In 10-minütigem Abstand gibt man unter Rühren nacheinander je 1 ccm der drei Reagenzien zu. Bei positivem Ausfall der Probe wird die Farbe sofort oder in den folgenden 10 Minuten, je nach Konzentration des nachzuweisenden Stoffes, sichtbar (vgl. unten).

Die typische rotstichig-violette Farbe tritt bei dieser Reaktion nur beim p-Aminophenolester auf, nicht dagegen bei p-Aminophenol (vgl. auch Schrader). Das Spaltprodukt von E 605, p-Nitrophenol, ergibt nach Reduktion und Behandlung nach Averell und Norris einen blauen Farbstoff, der aber im Gegensatz zu dem des Esters meist erst nach Stunden langsam auftritt und dann noch an Intensität zunimmt. Das gilt für Konzentrationen, mit denen man beim Nachweis an vergifteten Organen gewöhnlich arbeitet: bei reiner, relativ starker Aminophenol- bzw. reduzierter Nitrophenollösung kann eine leicht bläuliche Färbung schon in den ersten 10 Minuten auftreten (vgl. Versuch III), die aber im Laufe der Zeit sehr stark an Intensität zunimmt (vgl. Versuch III und IV,4). Charakteristisch für die Unterscheidung ist letztlich also nicht die Zeitspanne bis zum Auftreten der Farbe, sondern der Zeitpunkt des Farbmaximums. Nach Kaiser und Lang ist dieser für den blauen Aminophenolfarbstoff erst nach 24 bis 30 Stunden erreicht, während er bei dem rotstichig-violetten Farbstoff, wie man ihn durch Nachweis im Blut von Vergifteten bekommt, schon nach 20 Minuten erreicht ist; nach Angaben von Averell und Norris ist der rot-violette Farbstoff des Esters höchstens vier Stunden beständig. Wichtig zur Unterscheidung ist ferner die photometrische Bestimmung des Farbtons. Übereinstimmend mit Averell und Norris wurde für die blaue Farbe des p-Aminophenols ein Maximum bei 585 m μ gefunden, während die Farbe des Esters ein solches bei 555 m μ aufweist.

Die Reagenzien wurden immer im Eisschrank aufbewahrt. Da mit zunehmendem Alter derselben ihre Lichtdurchlässigkeit abnimmt (Averell und Norris), müssen sie wöchentlich frisch hergestellt werden. Der p_H-Wert der Versuchslösung soll nach Averell u. Norris

beim Kupplungsvorgang zwischen 0,6 und 1 betragen. Eigene Versuche ergaben, daß bei zwei Lösungen gleicher Konzentration mit den p_H -Werten von 4 und 5 kein Intensitätsunterschied bei der entstehenden Farbe zu erkennen ist. Dagegen tritt bei einem p_H von 7,2 nur noch eine leichte Färbung auf, die im Ton schon zwischen rötlich und hellbraun liegt (Diazo-Amino-Verbindung). Bei deutlich alkalischer Reaktion (p_H über 8) schließlich entsteht nur noch eine goldgelbe Färbung. - Weiterhin wurde festgestellt: aus jeder positiven Averell u. Norris Farbe bekommt man bei Laugenzugabe goldgelbe bis gelbbraune Farbtöne. Diese können bei Säurezugabe auch wieder in die ursprüngliche rot-violette Farbe zurückverwandelt werden. Es gelingt dagegen selbstverständlich nicht, eine Probe, die E 605 enthielt, bei der aber infolge alkalischer Reaktion keine positive Färbung aufgetreten war, durch nachträgliche Säurezugabe positiv zu machen. Es ist deshalb darauf zu achten, daß bei alkalischer Reaktion der Versuchslösung vor dem Diazotierungsvorgang entsprechend mehr Säure zugegeben wird.

3.) Alkalikochprobe.

Diese Reaktion nach Ketelaer und Hellingman ist wiederum nicht spezifisch für E 605, sondern weist nur ein Spaltprodukt des Esters, p-Nitrophenol nach. Daneben geben noch andere, natürlich vorkommende Stoffe, wie phenolische Körper, Milch (Schmidt), Kohlehydrate (Kaiser) und Vegetabilienextrakte (Derkosch) nach Zusatz von Alkalien ebenfalls Gelbfärbung.

Die Reaktion beruht auf einer Verseifung des Esters beim Kochen mit Natronlauge, wobei das Na-Salz von p-Nitrophenol abgespalten wird.

Durchführung der Reaktion:

Wenn nicht anders angegeben, wurde die Reaktion mit 2 cm Lösung durchgeführt, mit 1 Tropfen konzentrierter Natronlauge versetzt und mehrmals kurz aufgeköcht.

Wie aus Abschnitt A, Kap. I hervorgeht, tritt diese Hydrolyse von E 605 in wässriger Lösung schon bei Zimmertemperatur ein (vgl. auch Versuch II). Eigene Versuche zeigten, daß auch beim Kochen in saurem und neutralem Milieu teilweise Esterspaltung auftritt (s. Vers. I und II; vgl. S.v.Eicken). Die Spaltung in

saurem Milieu betrug jedoch nach 15-minütigem Kochen erst ca. 1/300 von der in alkalischem Milieu.

4.) Indophenolblaureaktion.

Diese Reaktion, die von Ullmann und Graedinger schon 1912 beschrieben wurde, weist p-Aminophenol bzw. reduziertes p-Nitrophenol nach. Sie beruht nach Dropmann auf Überführung des p-Nitrophenols durch Reduktion in p-Aminophenol und dessen Umwandlung in blaue Farbstoffe mit Hilfe von Phenol, Kresol oder Naphthol beim Übersättigen mit Ammoniak oder Natronlauge.

Reagenzien:

- 1) kaltgesättigte, wässrige Lösung von α -Naphthol, täglich frisch hergestellt
- 2) Ammoniaklösung
- 3) bei Nitrophenol: Titantrichloridlösung, 15%ig.

Durchführung der Reaktion:

2 ccm der gespaltenen und reduzierten E 605-Lösung (sauer) werden mit der gleichen Menge α -Naphthollösung versetzt und gleich mit Ammoniak übersättigt. Durch den Einfluß des Luft-sauerstoffs färbt sich dann das Gemisch je nach Gehalt sofort oder nach kurzer Zeit blau. Diese blaue Indophenolfarbe verstärkt sich beim Stehen an der Luft, geht später in Blau-Violett und schließlich in Violett über. Nach S.v.Eicken muß bei quantitativer Auswertung diese nach 30 Minuten erfolgen, da später wieder langsame Farbabnahme erfolgt. Zum p-Nitrophenolnachweis ohne vorherige Reduktion wird ebenfalls mit α -Naphthol versetzt wie oben, dann 1 ccm Titan-chloridlösung zur Reduktion zugesetzt und schließlich mit Ammoniak übersättigt, bis ein bleibender schwarzer Niederschlag entsteht, der nach 3-minütigem kräftigen Schütteln weiß geworden ist (Titanhydroxyd). Die Flüssigkeit wird zentrifugiert; bei positivem Ausfall ist das Zentrifugat blau gefärbt (vgl. v.Eicken).

Weinig hat neuerdings folgende einfache Methode zur Erzielung der Indophenolblaureaktion angegeben:

5 ml Wasserdampfdestillat des Mageninhalts werden mit Alkali aufgeköcht, abgekühlt, mit HCl schwach angesäuert (p_H 4 - 5), mit einigen Tropfen einer wäßrigen Orthokresollösung und einem linsengroßen Stück Natriumamalgam versetzt. Während des Reduktionsvorgangs wird die Lösung alkalisch, wobei sich der Farbstoff bildet. Ist die Lösung nicht alkalisch geworden, so muß sie mit wenig NaOH alkalisiert werden. - Sind nur Spuren von E 605 zu vermuten, so werden 10 ml Destillat (oder auch Harn) nach Kochen mit NaOH mit HCl schwach angesäuert und mit 20 ml Äther geschüttelt. Nach Ablassen der wäßrigen Phase werden in den Äther einige Tropfen einer wäßrigen Orthokresollösung und ein linsengroßes Stück Natriumamalgam gegeben. Am Boden des Scheidetrichters bildet sich mit eintretender alkalischer Reaktion eine leuchtend blaue Schicht.

II. Vorversuche.

Versuch I, Spaltung von E 605:

Herstellung einer ca. 1/2%igen wässrigen E 605 forte-Lösung (noch weißlich-trüb infolge der relativ starken Konzentration). Diese wurde gleichmäßig auf sechs Bechergläser verteilt und drei dieser Lösungen mit einigen Tropfen konzentrierter Salzsäure angesäuert. Nach Abdecken mit Uhrgläschen wurde nun je ein Glas mit neutraler und saurer Lösung 5 Minuten bzw. 10 Minuten und 15 Minuten lang gekocht. Der Flüssigkeitsverlust durch die Erhitzung wurde während des Kochens oder anschließend durch Hinzufügen von Aqua dest. ausgeglichen. Da aber auch p-Nitrophenol geringfügig flüchtig ist, entsteht durch die Auffüllung mit Aqua dest. ein Fehler, der bei exakter quantitativer Auswertung berücksichtigt werden muß. Der Fehler bei gleicher Kochzeit ist umso größer, je kleiner die Konzentrationen der Versuchslösung gewählt werden.

	Kochzeit	Reakt.bei NaOH-Zugabe in der Kälte	Bemerkung
nicht angesäuerte frische Lösung	---	keine Gelbfärbung	
angesäuerte Lösg.	5 Min.	Gelbfärbung	Bei tropfenweiser Laugenzugabe tritt die Gelbfärbung schlagartig in voller Intensität auf, bei weiterer NaOH-Zugabe keine Steigerung.
" "	10 Min.	stärkere Färbg.	
" "	15 Min.	noch stärk. F.	
nicht anges.Lösg.	5 Min.	Gelbfärbung	Die Gelbfärbung tritt schon während des Kochens auf. Keine Steigerung der Farbintensität bei NaOH-Zugabe in der Kälte.
" " "	10 Min.	stärkere Färbg.	
" " "	15 Min.	noch stärk. F.	

Dabei ist darauf zu achten, daß nach dem Kochen die Lösung gekühlt und die Lauge kalt zugegeben wird, da sonst bei der Laugenzugabe in die noch warme Lösung weitere Spaltung erfolgt. - Bei Säurezugabe verschwindet die gelbe Farbe schlagartig vollständig. Es tritt also durch Kochen von E 605-Lösung sowohl bei

saurer als auch bei neutraler Reaktion eine Spaltung des Moleküls ein.

Versuch II, Spaltung von E 605:

In vier Reagenzgläser wurden je 6 ccm einer 4 Tage alten, schon etwas gelblich verfärbten, ca. 1/2%igen E 605-Lösung gegeben. Die vier Lösungen wurden nicht, bzw. 5 Min., 10 Min. und 15 Min. lang ohne weiteren Zusatz gekocht. Man ersetzte die verdampfte Flüssigkeit wie beim vorhergehenden Versuch durch Aqua dest. Nach Abkühlung wurde mit den vier Lösungen die Indophenolblaureaktion durchgeführt, wobei mit Titanchlorid reduziert wurde. (Durchführung s. Abschn. B, Kap. I/4.)

Ergebnis:

Der Farbvergleich nach 30 Minuten ergab einen positiven Ausfall aller vier Proben. Intensiv blaue Farbe trat bei keiner der Proben auf trotz der relativ starken Lösung; alle Proben hatten nur hellblaue Farbe, d.h. also, daß die Spaltung nur gering oder eine Reaktionshemmung eingetreten ist. Der positive Ausfall der ungekochten Lösung ist zweifellos auf das freie Nitrophenol zurückzuführen, das sich während des 4-tägigen Stehens der E 605-Lösung gebildet hatte, wie auch schon die gelbliche Verfärbung andeutete. Die Intensitätszunahme der Farbe kam nur deutlich zwischen Probe 1 und 2 (nicht und 5 Min. gekocht) heraus. Zwischen der 10 und 15 Minuten gekochten Lösung konnte mit bloßem Auge überhaupt kein Unterschied mehr in der Farbintensität festgestellt werden.

Versuch III:

a) Destillation von frischem p-Aminophenolhydrochlorid.

Mit einer 1 o/oo igen, wässerigen, frisch hergestellten Lösung von Merck'schem p-Aminophenolhydrochlorid, die im Gegensatz zur älteren Lösung völlig farblos war, wurden folgende Bestimmungen durchgeführt:

- 1) spektrophotometrische Messung
- 2) Reaktion nach Averell u. Norris mit 20 ccm ohne Reduktion
- 3) Indophenolblaureaktion mit ca. 5 ccm ohne Reduktion.

Außerdem wurden 50 ccm der einfachen Destillation unterworfen. Während das Destillat selbst völlig farblos und klar war, wies der Rückstand im Kolben eine gelbbraune Farbe auf. Das Destillat wurde

- 1) spektrophotometrisch gemessen
- 2) mit 5 ccm die Indophenolblaureaktion ohne Reduktion durchgeführt.

Ergebnis:

frische Lösung:

- 1) Die spektrophotometrische Messung ergab ein Minimum bei 250 m μ , ein Maximum bei 275 m μ .
- 2) Die Reaktion nach Averell u. Norris fiel ohne Reduktion stark positiv aus; infolge der relativ starken Konzentration (1 mg/ccm!) trat gleich nach Zugabe des letzten Reagens eine Färbung auf, die sich über Nacht zu tiefem Stahlblaugrau steigerte.
- 3) Die Indophenolblaureaktion ohne Reduktion war positiv.

Destillat:

- 1) Hier ergab die Messung eine völlig andere Kurve, das Minimum lag etwa bei 265 m μ , das Maximum zwischen 290 und 295 m μ , also beides war weit nach rechts verschoben.
- 2) Die Indophenolblaureaktion ohne Reduktion war deutlich positiv.

Daraus ergibt sich, daß bei der Destillation von p-Aminophenolhydrochlorid eine Veränderung eingetreten war. Die positive Indophenolblaureaktion im Destillat sprach für etwa 1/100 der vorgelegten Menge.

b) Destillation von älterem p-Aminophenolhydrochlorid.

Eine sechs Wochen alte, etwa 1% ige, inzwischen bräunlich verfärbte wässrige Lösung von Merck'schem p-Aminophenolhydrochlorid (Aufbewahrung bei Zimmertemperatur) wurde der einfachen Destillation unterworfen:

- 1) ohne weiteren Zusatz
- 2) unter Zusatz von Formalin.

Ergebnis:

- 1) Bei Zugabe von NaOH in der Kälte trat beim Destillat eine Rotfärbung auf, die beim Erhitzen verschwand.
- 2) Die spektrophotometrische Messung der beiden Destillate ergab jeweils ein Maximum bei 245 m μ , das bei der mit Formalin versetzten Lösung eine geringere Höhe aufwies.

Das Destillat dieser älteren p-Aminophenolhydrochloridlösung weist also eine völlig andere Absorption auf, wie das vorher erörterte Destillat der frischen Lösung.

c) Vergleich der Messungen einer p-Aminophenolhydrochloridlösung in frischem und gealtertem Zustand.

Eine 0,1 o/oo ige wässerige p-Aminophenolhydrochloridlösung wurde frisch hergestellt und gemessen. Dieselbe Lösung wurde nun bei Zimmertemperatur aufbewahrt und von Zeit zu Zeit erneut gemessen.

Es zeigte sich, daß nach siebentägigem Stehen (die Lösung hatte sich inzwischen bräunlich verfärbt und leicht getrübt, das Minimum (bei 250 μ) und das Maximum (bei 275 μ) sich noch nicht verschoben hatten; lediglich die Gesamtaborption war etwas erhöht, und zwar im kurzwelligen Bereich (Min.) mehr als im langwelligen (Max.). Nach acht Wochen hatte die Gesamtaborption weiter zugenommen und Minimum und Maximum waren etwas näher zusammengedrückt;

diese Feststellung spricht aber kaum für eine Zersetzung des absorbierenden Stoffes. Vielmehr wird es sich dabei im Sinne der Rayleigh'schen Theorie infolge der zunehmenden geringen Trübung der Lösung, die auf suspendierten Teilchen beruht, um Streulicht handeln. Durch den starken Anstieg des Streulichtes, d.h. durch die starke Absorptionszunahme mit abnehmender Wellenlänge, läßt sich sehr wohl das Zusammenrücken von Minimum und Maximum bei der alten Lösung erklären.

Versuch IV: Extraktion von p-Nitrophenol aus einer Muskelsuspension.

Die Extraktion erfolgte aus einer Muskelsuspension, die fünf Wochen vorher hergestellt worden war. Die Suspension enthielt 100 g Muskulatur auf 4 l Wasser und außerdem 50 mg p-Nitrophenol pro Liter, die in pulveriger Form zugesetzt worden waren (Herstellung wie in Abschn. B, Kap. III/1 beschrieben).

50 ccm dieser Lösung wurden filtriert, was etwa 3/4 Stunden in Anspruch nahm. Das Filtrat wurde in einen Scheidetrichter gegeben, mit HCl angesäuert bis zur sauren Reaktion und mit der doppelten Menge Äther überschichtet. Nun wurde das Ganze bis zur völligen Abkühlung in den Eisschrank gebracht und anschließend die Extraktion durchgeführt; dabei ist darauf zu achten, daß durch zu starkes Schütteln keine Emulgierung erfolgt. Die unten sitzende wässerige Phase wird abgelassen und der Ätherextrakt zur Entwässerung mit 5 g Natriumsulfat versetzt. Nach Filtrierung der Lösung wird der Äther mit dem Föhn vorsichtig abgedampft. Als Rückstand verbleibt wenig wässrige Flüssigkeit mit braunen Flocken, die mit 20 ccm Wasser auf-

genommen wurden. Mit der so erhaltenen gelblichen Lösung, in der durch das Verfahren p-Nitrophenol angereichert wurde, wurden folgende Bestimmungen durchgeführt:

- 1) spektrophotometrische Messung
- 2) Zugabe von Natronlauge in der Kälte
- 3) Indophenolblaureaktion nach Reduktion
- 4) Reaktion nach Averell u. Norris nach Reduktion mit 10 ccm.

Ergebnis:

- 1) Spektrophotometrische Messung: das für p-Nitrophenol charakteristische Maximum zwischen 315 und 320 m μ kam deutlich heraus; das Minimum war nach den kurzen Wellenlängen hin verschoben (da keine reine Lösung!).
- 2) Bei NaOH-Zugabe in der Kälte trat starke Gelbfärbung auf.
- 3) Die Indophenolblaureaktion nach vorheriger Reduktion verlief positiv.
- 4) Reaktion nach Averell u. Norris nach vorheriger Reduktion: Es trat zunächst nur eine schwache blaue Färbung auf, die sich aber bis zum nächsten Tag stark vertiefte (charakteristisch für freies Aminophenol).

Nach dem Verlauf von fünf Wochen war also noch p-Nitrophenol in der Muskelsuspension nachweisbar; das schließt jedoch nicht aus, daß bei geringerer Menge sich das p-Nitrophenol dem Nachweis entziehen kann.

Versuch V: Destillat von fauler Leber.

100 g gefaulter, übelriechender Leber wurden zerkleinert, mit ca. 400 ccm Wasser versetzt, homogenisiert und dann der einfachen Destillation unterworfen. Das Organ stammte von einem 6 1/2 Monate zuvor bei einem Verkehrsunfall in betrunkenem Zustand Getöteten. Es war im Kühlschrank bei +1°C aufbewahrt worden.

Die Untersuchung des Destillates ergab folgendes:

- 1) Spektrophotometrische Messung: die Extinktionskurve zeigte das für Organdestillate übliche Bild ohne weitere Besonderheiten.
- 2) Die Reaktion nach Averell u. Norris, die nach der Reduktion des Destillates durchgeführt wurde, verlief negativ; bemerkenswert ist allerdings, daß sich die Tropfen des letzten Reagens, sobald sie in die Lösung fielen, sofort kräftig dunkelrot färbten; nach geringem Schütteln verschwand diese Färbung ebenso plötzlich

und machte einer hellgelben Färbung der Lösung Platz.
Nach eintägigem Stehen war die Lösung fast farblos geworden.

3) Die Alkalikochprobe verlief negativ, ebenso

4) die Indophenolblaureaktion.

Aus dem Destillat dieser wässerigen Suspension von 6 1/2 Monate alter, gefaulter Leber konnten somit weder Aminophenol noch Nitrophenol oder andere Substanzen mit gleicher Reaktionsfähigkeit nachgewiesen werden.

Eine Gelbfärbung bei der Reaktion nach Averell u. Norris von nicht E 605-haltigen Leberdestillaten wurde öfters beobachtet, ebenso die weinrote Verfärbung der Tropfen des zuletzt zugegebenen Reagens. Die Ursache hierfür ist noch nicht bekannt. Die Gelbfärbung der Lösung wird dabei umso kräftiger und bräunlicher, je mehr von dem letzten Reagens zugegeben wird. Es setzt sich dann ein Bodensatz ab.

Versuch VI: Destillation von p-Aminophenolester aus E 605.

Um den Aminophenolester zu erhalten, wurde eine E 605-Lösung im Rückflußkühler (zur Vermeidung von Verlusten) durch Kochen mit Zink und Salzsäure reduziert. Nach 15-minütigem Kochen zeigte sich nach Zugabe von NaOH und Kochen keine Gelbfärbung mehr, was für die Reduktion nahezu des gesamten E 605 spricht. Die Indophenolblaureaktion verlief ebenfalls negativ, ein Zeichen, daß kein freies Aminophenol vorlag, sondern Aminophenolester.

Dieses Verfahren wurde zunächst mit einer 10 Tage alten wässerigen E 605-Lösung mit der Konzentration von 20 Gamma/ccm und dann mit einer frisch hergestellten 1 o/o igen E 605-Lösung durchgeführt.

Die spektrophotometrische Messung der so erhaltenen Aminophenolester-Lösungen ergab:

	schwächere ältere Lösung (20 g/ccm)	stärkere frische Lösung (10 mg/ccm)
Minimum:	240 mp	235 mp
Maximum:	255 mp	260 mp

Die Reaktion nach Averell u. Norris ohne Reduktion, die bei der frischen Lösung durchgeführt worden war, zeigte einen

kräftigen dunkelrotvioletten Farbton, wobei auch nach eintägigem Stehen diese mehr ins Rötliche gehende Farbe beibehalten wurde.

Die Indophenolblaureaktion verlief bei der stärkeren Lösung kräftig positiv, bei der schwächeren dagegen negativ.

Die Ergebnisse des Destillates dieses Esters (von 100 ccm wurden 50 ccm überdestilliert) waren:

	schwächere ältere Lösung (20 g /ccm)	stärkere frische Lösung (10 mg/ccm)
1) Spektrophotom. Messung	zu schwach zur Messung, statt Kurve eine Gerade	Kurvenverlauf entsprach völlig dem der nicht destillierten Lösung.
2) Reakt.n.Averell u. Norris (ohne Red.)	negativ, gelbe Färbung, die sich nach eintäg. Stehen in ein klares Gelbbraun verwandelt hatte.	positiv, schön rotviolett; nach eintägigem Stehen mehr violetter Farbton.
3) Indophenolblau- reaktion	negativ	positiv, schön blauer Farbton.

Die Ergebnisse zeigen, daß der Aminophenol-Ester nur zu einem Teil flüchtig ist. Ein Farbvergleich der beiden Lösungen, wie sie nach Durchführung der Reaktion nach Averell u. Norris erhalten wurden, zeigte, daß etwa 1/200 des Esters ins Destillat übergegangen ist.

Die stark positive Indophenolblaureaktion vor und nach der Destillation spricht für das Vorhandensein von freiem p-Aminophenol, das durch eine geringfügige Spaltung von E 605 beim Erhitzungsvorgang (vgl. Versuch I) und nachfolgender Reduktion des p-Nitrophenols zu erklären ist. Hinsichtlich der Destillierbarkeit von p-Aminophenol vgl. Versuch III. Bei der schwächeren Lösung war entweder schon primär zu wenig p-Aminophenol zur Auslösung einer positiven Indophenolblaureaktion vorhanden, oder das entstandene Aminophenol wurde durch die längere Kochzeit zum größten Teil in einen Stoff verwandelt, der keine Farbreaktion mehr abgibt (vgl. Versuch X), so daß durch diese sekundäre Verminderung keine positive Reaktion mehr zustande kam.

Versuch VII: Destillation von Aminophenol-Ester aus E 600.

Die Durchführung ist die gleiche wie bei Versuch VI, nur diente als Ausgangsprodukt E 600 = Mintacol (in Ampullen im Handel), das den gleichen Molekülaufbau wie E 605 zeigt, aber statt dem Schwefel-Atom ein Sauerstoff-Atom an P gebunden enthält. Die 1%ige wässrige Ausgangslösung wies bei der Alkalikochprobe eine deutliche, mittelstarke Gelbfärbung auf und eine schwach positive Indophenolblaureaktion.

Nach der Reduktion zeigte

- 1) die spektrophotometrische Messung einen ähnlichen Kurvenverlauf wie die reduzierte 1 o/o ige E 605-Lösung von Versuch VI, nur war das Minimum etwas nach rechts verschoben;
- 2) die Reaktion nach Averell u. Norris ohne Reduktion positiven Ausfall mit einem kräftigen rotvioletten Farbton;
- 3) die Indophenolblaureaktion ohne Reduktion negativen Ausfall.

Ergebnisse des Destillates der reduzierten Mintacollösung (von 100 ccm 50 ccm überdestilliert):

- 1) Spektrophotometrische Messung: sie ergab nichts Charakteristisches mehr, da die Konzentration schon zu schwach war.
- 2) Reaktion nach Averell u. Norris ohne Reduktion: positiv.
- 3) Indophenolblaureaktion ohne Reduktion: negativ.

Ein Farbvergleich der beiden Averell u. Norris-Farben vor und nach der Destillation ergab nach eintägigem Stehen eine Verfärbung der Destillatprobe mehr nach der violetten Seite, während die nicht destillierte Probe mehr rotviolet blieb, jedoch war der Farbtonunterschied nicht so stark wie bei Versuch VI. Es war schätzungsweise 1/70 des Esters bei der Destillation übergegangen.

Versuch VIII: Destillation von p-Nitrophenol aus E 605 in alkalischem Milieu.

200 ccm von 0,25 o/o iger E 605-Lösung wurden zur Spaltung des Esters mit Natronlauge wie üblich gekocht. Anschließend wurde die alkalische Lösung der Destillation unterworfen: von 200 ccm wurden 100 ccm überdestilliert. Das Destillat war zunächst weißlich trüb, wies aber mit Natronlauge intensive Gelbfärbung auf.

Ergebnis:

Die spektrophotometrische Messung des Destillates ergab die für p-Nitrophenol typischen Werte; ein Vergleich der Intensität der Gelbfärbung mit Alkali vor und nach der Destillation zeigte, daß etwa 1/10 überdestilliert war.

Versuch IX: folgende Lösungen wurden der Reaktion nach
Averell u. Norris unterworfen:

- | | |
|--|-------------|
| 1) Leberdestillat, nicht red. u. nicht angesäuert | Gelbfärbung |
| 2) Leberdestillat, reduziert, also sauer | Gelbfärbung |
| 3) Leberdestillat, nicht red. aber angesäuert
+ 1 Tropfen Aminophenolester-
lösung | positiv! |
| 4) 20 ccm E 605-Lösung (25 Gamma/ccm), einige Tage alt,
nicht red., angesäuert | negativ |

Es tritt also nach wenigen Tagen wohl eine Spaltung des E 605-Moleküls, aber keine Reduktion ein.

- | | |
|---|--|
| 5) 20 ccm Wasser + 2 Tropfen p-Aminophenolhydrochlorid-
lösung, mit HCl angesäuert | |
| 6) 20 ccm Wasser + 2 Tropfen p-Aminophenolhydrochlorid-
lösung, zusätzliche Behandlung mit
HCl und Zn | |

Ergebnis:

	Lösung 5)	Lösung 6
noch nach einer Stunde:	negativ	negativ
nach eintägigem Stehen:	positiv	positiv
Intensität und Farbton:	sehr schön blau	nur leicht bläulich, etwa 1/7 der Intensität von 6); etwas mehr violett wie 6).

Es hat sich durch die Erhitzung beim Reduktionsvorgang der größere Teil des p-Aminophenols in ein Produkt verwandelt oder zersetzt, das keinen positiven Ausfall der Farbreaktion mehr bewirkt (vgl. auch Versuch III a).

Der mehr violette Farbton, der hier nur wenig auffällt, scheint auch mit der Erhitzung im allgemeinen zusammenzuhängen bzw. mit Verunreinigungen, denn es zeigte sich, daß das p-Aminophenol, das durch Spaltung und Reduktion von E 605 erhalten wurde, nie einen klaren blauen Farbton, sondern immer einen blauvioletten ergab. Eventuell noch vorhandener Aminophenolester würde den Farbton nach Rotviolett verschieben; man darf deshalb nur dann die entstandene Farbe als p-Aminophenolfarbe ansprechen, wenn sie bei schwach konzentrierter Lösung erst nach Stunden auftritt, sich dann weiter verstärkt und stahlblau bis blaugrau ist.

Versuch X: Vergleich der Averell u. Norris-Reaktion von gespaltenem und ungespaltenem E 605.

Als Ausgangssubstanz diente eine schwach konzentrierte E 605-Lösung. Je eine Hälfte dieser Lösung wurde

- 1) mit Salzsäure und Zink reduziert und dann im Eisschrank der Reaktion nach Averell u. Norris unterworfen, bzw.
- 2) durch Kochen mit Natronlauge gespalten (p-Nitrophenol entsteht, Gelbfärbung), gekühlt, anschließend ebenso reduziert und im Eisschrank der Averell u. Norris-Reaktion unterworfen.

Ergebnis:

Es zeigte sich, daß im ersteren Falle, also beim Ester, so gleich nach Durchführung der Reaktion eine deutliche rotviolette Färbung auftrat. Im zweiten Fall dagegen konnte am Abend, etwa eine Stunde nach Durchführung der Reaktion noch keine Färbung erkannt werden, am nächsten Morgen hatte sich die Lösung leicht blaugrau verfärbt. Der Unterschied im Farbton ist der für Ester und gespaltenen Ester charakteristische. Der Unterschied in der Farbintensität stimmt mit den Angaben von Schrader überein, wonach p-Aminophenol teilweise in Chinon übergeht, das keine Farbreaktion gibt.

Versuch XI: Messungen mit reinen verdünnten Lösungen.

Zur Orientierung wurden die Extinktionskurven von reinen wässrigen Lösungen gemessen (gegen Wasser in 2 cm-Küvetten), und zwar im ultravioletten Bereich. Verdünntes E 605 forte hat sein Minimum bei 236 m μ , sein Maximum bei 271 m μ . Wie in unserem Institut festgestellt werden konnte (Schmidt), handelt es sich hierbei aber um eine Summenkurve, da auch der Emulgator eine Absorption im UV-Bereich aufweist (Min. bei 237 m μ , Max. bei 261 m μ). Reine E 605-Lösung ohne Emulgator weist ein Minimum bei 235 m μ , ein Maximum bei 278 m μ auf. Um die Konzentrationen zu bestimmen, bei der die Kurve am besten aufzunehmen ist, wurde eine Verdünnungsreihe hergestellt. Es zeigte sich, daß bei den Lösungen, die über 40 Gamma/ccm Reinsubstanz enthielten, die Extinktionen den Meßbereich überschritten. Die besten Kurven bekommt man bei Konzentrationen zwischen 10 und 20 Gamma/ccm; bei 5 Gamma/ccm kommen die Charakteristika der Kurve noch deutlich heraus, während das bei 1 Gamma/ccm nicht mehr der Fall ist. Abbildungen der Kurven sind der Veröffentlichung von Schmidt zu entnehmen.

Übersicht über die Charakteristika verschiedener Lösungen:

Stoff:	Min. bei	Max. bei	Bemerkungen:
E 605 forte	236 m μ	271 m μ	Interferenzkurve
Reines E 605 ohne Emulgator	234 m μ	278 m μ	
Emulgator	237 m μ	261 m μ	
E 600 (Mintacol)	240 m μ	280 m μ	
p-Nitrophenollsg.	255 m μ	315 m μ	
p-Nitrophenollsg. mit 1 Tr. NaOH	255 m μ	315 m μ	zusätzl. Max. bei 405 m μ etwa (Gelbfärbung)
p-Aminophenolhydro- chlorid (von Merck)	250 m μ	275 m μ	

III. Hauptversuchsreihe.

1.) Anordnung und Durchführung der Hauptversuchsreihe.

100 g frischer menschlicher Muskulatur wurden grob zerkleinert, dann durch den Fleischwolf getrieben und schließlich unter Wasserzusatz im Ultraturrax homogenisiert. Nun wurde mit Leitungswasser auf sechs Liter aufgefüllt. Von diesen blieben 2 l unverändert, 2 l wurden mit 10 mg E 605 Reinsubstanz und 100 ccm konz. Formalin versetzt, den restlichen 2 l wurde 10 mg E 605 Reinsubstanz zugesetzt. Die letzten 2 l teilte man noch einmal in drei gleiche Teile: ein Teil blieb ohne weiteren Zusatz, einem Teil wurde ein Acetat-Veronalpuffer¹⁾ zugesetzt vom $p_H = 4,4$ und dem dritten Teil setzte man 10 g NaHCO_3 zu. Somit sind fünf Suspensionen entstanden, die folgendes enthalten:

- I. Muskelsuspension ohne Zusatz
- II. Muskelsuspension mit E 605 und Formalin
- III. Muskelsuspension mit E 605, neutral (p_H ca. 6)
- IV. Muskelsuspension mit E 605, sauer (p_H ca. 5)
- V. Muskelsuspension mit E 605, alkalisch (p_H ca. 8)

Der E 605-Zusatz von 10 mg/2 l, also 5 Gamma/ccm ist so gering, daß selbst bei einer Löslichkeit von 1:50 000 (ohne Emulgator) alles gelöst ist. Die fünf Suspensionen werden im folgenden immer mit ihrer Nummer bezeichnet. Im Abstand von einigen Tagen wurden nun mit allen fünf Suspensionen laufend folgende Versuche durchgeführt:

- a) mit den Filtraten: 1) spektrophotometr. Messung
- 2) Alkalikochprobe
- 3) Reaktion nach Averell u. Norris
 - a) nach vorheriger Reduktion
 - b) ohne vorherige Reduktion
- b) mit den Destillaten:
 - 1) spektrophotometr. Messung
 - 2) Alkalikochprobe

1) Vgl. die neueren Veröffentlichungen von Weinig u. Mitarb., Paulus u. Mallach über positiven Ausfall der Averell u. Norris-Reaktion bei Barbituraten: Mengen ab etwa 100 mg Barbiturat ergeben deutlich positive Averell- u. Norris-Reaktion. Bei Durchführung der Versuche waren diese Ergebnisse noch nicht bekannt.

3) Reaktion nach Averell u. Norris

a) nach vorheriger Reduktion

b) ohne vorherige Reduktion.

Die Filtrate benötigten mehrere Stunden zum Durchlaufen und wurden daher, wenn möglich, am Abend bereits für den nächsten Tag angesetzt. Mit zunehmender Fäulnis veränderten sich die Flüssigkeiten dahingehend, daß besonders die Suspensionen I, III und V trüber und damit schwerer filtrierbar wurden, während Suspension IV im Laufe der Zeit zunehmende Klärung zeigte. Auch hinsichtlich der Farbe traten Veränderungen ein: die Suspensionen I, III und V verfärbten sich gelbrot-bräunlich gegenüber dem frischen Rosa zu Beginn, Suspension II und IV dagegen wurden farbloser.

Zur Durchführung der Filtratreaktionen benötigte man jeweils 50 ccm von jeder Suspension, wovon je 20 ccm für die Reaktion nach Averell u. Norris mit und ohne Reduktion bestimmt waren, 2 ccm für die Alkalikochprobe und der Rest für die spektrophotometrische Messung.

Für die Destillatreaktionen reichten je 100 ccm; davon wurden 50 ccm überdestilliert und damit die Reaktionen wie bei den Filtraten durchgeführt. Vor der Destillation säuerte man die Suspensionen mit etwas Weinsäure an, wobei zu Suspension V entsprechend mehr zugesetzt wurde. Der für die spektrophotometrische Messung bestimmte Anteil kam sofort nach der Destillation in den Eisschrank, unmittelbar nach Abkühlung erfolgte die Messung: gegen Wasser, in 2 cm-Küvetten.

2.) Reinigung.

Die benutzten Gläser, Pipetten und Filter wurden nach Gebrauch zuerst unter fließendem Wasser von der größten Verunreinigung befreit, dann mit Benzol gründlich mechanisch gereinigt, anschließend wieder mit Wasser ausgespült und bis zur nächsten Benutzung in Dichromatschwefelsäure aufbewahrt. Vor Gebrauch wurde noch einmal mit Leitungswasser, anschließend mit Aqua dest. ausgewaschen. Bei Geräten, die der mechanischen Reinigung zugänglich sind, genügt diese Methode, wie mehrmals durchgeführte Leerversuche bewiesen. Dagegen ist zur Säuberung des Destillierapparates unbedingt erforderlich, daß vor jeder Destillation neben

der üblichen Reinigung noch jeweils eine Menge von etwa 300 ccm Wasser, je nach dem Grad der Verunreinigung, hindurchdestilliert wird, das die restlichen Verunreinigungen aufnimmt. Die letzte Fraktion des Destillats wird aufgefangen, reduziert und nach Abkühlung die Reaktion nach Averell u. Norris durchgeführt. Erst bei negativem Ausfall derselben darf der Apparat für das Organdestillat benutzt werden. Dieses Verfahren ist zwar sehr zeitraubend, aber leider nicht zu umgehen, schon gar nicht beim Nachweis in der Praxis.

3.) Ergebnisse der spektrophotometrischen Messungen.

Filtrate.

Die Extinktionskurven der fünf Filtrate (s. Abb. I) verlaufen alle ziemlich gleichmäßig flach und steigen gegen die kleinen Wellenlängen hin steil an. Eindeutige Maxima kamen bei keiner der Kurven, die im Laufe der Zeit gemessen wurden, heraus. Andeutungen eines Maximums zwischen 255 und 275 μ wurden bei den Filtraten I, III und V bemerkt, während bei den Filtraten II und IV niemals auch nur die Andeutung eines Maximums beobachtet wurde. Die Messungen erstreckten sich insgesamt über einen Zeitraum von 5 Wochen. Eine auffällige Veränderung der Kurven im Laufe dieser Zeit konnte nicht beobachtet werden.

Destillate.

(s. Abb. II). Übereinstimmend mit ihren Filtratkurven verlaufen die Destillatkurven der Suspension IV ohne jedes Maximum. Im Gegensatz zu den Filtratkurven weisen die Destillatkurven von Suspension II immer ein Maximum auf, das zwischen 285 und 275 μ schwankt, während das Minimum zwischen 250 und 255 μ liegt. Die Höhe des Maximums bleibt während der ganzen Versuchszeit ungefähr gleich.

Die Destillate I, III und V haben konstante Maxima zwischen 270 und 275 μ und Minima zwischen 240 und 250 μ . Es erscheint dabei die Kurve von Destillat V gegenüber der von Destillat III wenige μ nach den längeren Wellen hin verschoben. Die Maxima der Destillate I, III und V, die bei der ersten Messung, drei Tage nach dem Ansetzen der Suspensionen noch gar

ABBILDUNG I

Kurven der Filtrate vom 24.8.:

- I. Muskelsuspension ohne Zusatz
- II. Muskelsuspension mit E 605 und Formalin
- III. Muskelsuspension mit E 605, neutral (p_H ca.6)
- IV. Muskelsuspension mit E 605, sauer (p_H ca.5)
- V. Muskelsuspension mit E 605, alkalisch (p_H ca.8)

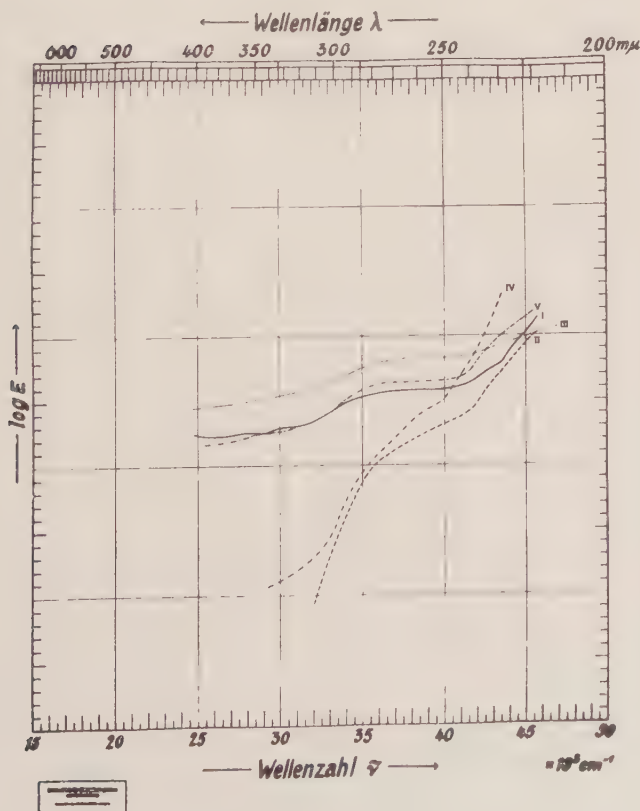
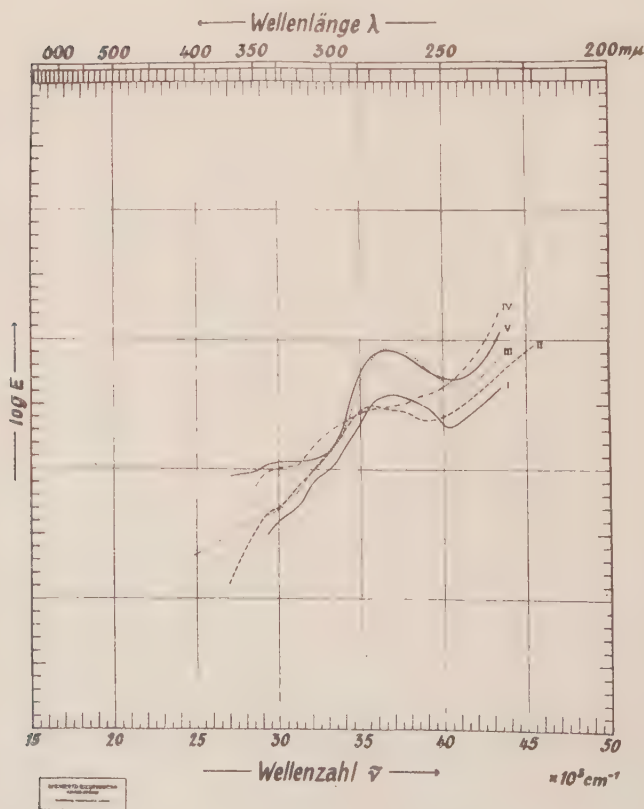


ABBILDUNG II

Kurven der Destillate vom 27.8.:

- I. Muskelsuspension ohne Zusatz
- II. Muskelsuspension mit E 605 und Formalin
- III. Muskelsuspension mit E 605, neutral (p_H ca. 6)
- IV. Muskelsuspension mit E 605, sauer (p_H ca. 5)
- V. Muskelsuspension mit E 605, alkalisch (p_H ca. 8)



nicht vorhanden waren, sind nach insgesamt fünf Tagen bereits deutlich und nehmen an Höhe im Laufe der Zeit kontinuierlich zu.

Zur Auswertung wichtige Voraussetzungen.

Zur exakten Auswertung der gewonnenen Kurven ist es nötig, eine möglichst umfassende Vorstellung von den Faktoren zu haben, die eventuell eine Abweichung im Kurvenverlauf bedingen können. Außer durch Variation von Konzentration und Schichtdicke (s. Abschn. B, Kap. I, 1) können nach Mayer und Luszczak Veränderungen der Kurve zustande kommen:

1. durch Beimengung eines anderen absorbierenden Stoffes;
2. durch den sog. "Salzfehler", der durch Zusatz von Salzen und Eiweiß auftreten kann. Er wird auf Wechselwirkungen der Kraftfelder der Moleküle des absorbierenden Stoffes sowohl untereinander als auch mit den Molekülen des Lösungsmittels und damit auf Moleküldeformationen zurückgeführt. Hierdurch wird sowohl Höhe als auch Lage des Maximums verändert;
3. durch chemische Reaktion der absorbierenden Substanz mit einem noch anwesenden aber selbst nicht absorbierenden Stoff (z.B. Lösungsmittel usw.);
4. durch chemische Umwandlung der absorbierenden Substanz, wie Dissoziation, Assoziation, Umlagerungen (Tautomerie);
5. durch kolloidal gelöste Stoffe. Diese können starke Fälschungen des Meßergebnisses bewirken infolge Lichtstreuung, besonders im kurzwelligen Gebiet;
6. durch nicht sichtbare Verunreinigungen der optischen Flächen. Das Meßergebnis kann dadurch beeinflußt werden;
7. durch die Temperatur. Eine Temperaturerhöhung bewirkt in der Regel eine Verschiebung nach Rot. Wenn die Genauigkeit von 1% gewahrt werden soll, muß die Temperatur nach Kortüm auf $\pm 1^{\circ}$ genau definiert werden;
8. durch den sog. "Weißlichtfehler" bei Verwendung von nicht genügend monochromatischem Licht.

Da in unserem Falle nicht mit reinen Stofflösungen gearbeitet wurde, und auch in den Destillaten mit Sicherheit außer dem unveränderten E 605 noch andere absorbierende oder nicht absorbierende Stoffe vorliegen, interessieren hier besonders Punkt 1) bis

5). Punkt 1) bedarf der Ergänzung:

Liegen zwei oder mehrere absorbierende Stoffe in einem Lösungsmittel vor, ohne daß diese chemisch miteinander reagieren, dann addieren sich bei den einzelnen Wellenlängen zu den Extinktionswerten des zu bestimmenden Stoffes die des beigemengten. Die erhaltene Extinktionskurve stellt also eine Summenkurve dar. Dies bedingt aber stets eine mehr oder minder starke Verzerrung der Form der Kurve des zu bestimmenden Stoffes. Die Stärke der Beeinflussung durch den beigemengten Stoff ist naturgemäß konzentrationsabhängig. Daraus ergibt sich: Das Maximum einer überlagerten Kurve kommt dann unverändert zum Vorschein, wenn das Maximum des beigemischten Stoffes weit entfernt liegt, es entstehen zwei Gipfel. Ein kleines Maximum kann aber auch vom anderen absorbierenden Stoff verschluckt werden, wenn dessen Kurve in dem betreffenden Bereich sehr steil ansteigt. Je näher die Maxima beider Extinktionskurven beisammen liegen (bei konstanter Steilheit), desto leichter tritt in der Summenkurve eine Verschiebung der beiden Maxima nach der Mitte zu ein, und schließlich können beide Maxima zu einem dazwischenliegenden verschmelzen.

Auswertung der Filtratkurven.

Bei allen Absorptionsmessungen ist Voraussetzung, daß die verwendeten Flüssigkeiten optisch klar sind, da die an schwebenden Teilchen durch Beugung und Reflexion hervorgerufenen Lichtverluste besonders im ultravioletten Bereich zu ganz erheblichen Verfälschungen der Meßergebnisse führen können. Diese Voraussetzung ist bei den Filtraten nicht erfüllt, sie sind auch nach zweimaligem Filtrieren noch trüb. Es war eine Verdünnung der gewonnenen Filtrate mit Wasser auf 1/10 notwendig, um überhaupt meßbare Werte zu bekommen, womit die Aussicht auf ein charakteristisches Maximum wieder geringer wurde. Die Benutzung eines engerporigen Filterpapiers würde das Filtrieren überhaupt unmöglich machen; zum Nachweis von E 605 sind somit Filtratkurven unbrauchbar.

Auswertung der Destillatkurven.

Wie vorher schon erwähnt, handelt es sich auch dabei zweifellos um Summenkurven. Das reine E 605 weist ein Maximum bei 278 μ auf. Hier aber ist bei den Destillaten I, III und V ein solches zwischen 270 und 275 μ vorhanden; bei Destillat IV tritt dieses nicht in Erscheinung. Wie die Reaktion nach Averell und Norris später zeigt, weist aber gerade Destillat IV eine besonders starke positive Färbung auf.

Aus den Arbeiten von Paulus und Mallach, Weinig und Mitarbeitern wurde nach Durchführung unserer Versuchsreihe erst bekannt, daß Barbitursäurederivate bei saurer Reaktion mit Wasserdämpfen flüchtig sind. Da aber Barbiturate eine verhältnismäßig starke Ultraviolett-Absorption zeigen, die bei saurer Reaktion ein Maximum bei 220 μ und bei stark alkalischer Reaktion ein Maximum zwischen 240 und 255 μ (p_H 10 bis p_H 13) aufweist ist das Ergebnis der spektrophotometrischen Messungen bei Destillat IV verständlich; denn hier wurde zur Aufrechterhaltung der sauren Reaktion der Ausgangssuspension ein Veronal-Acetat-Puffer zugesetzt. Nach Paulus u. Mallach, Weinig u. Mitarbeitern reagieren Barbiturate auch nach Averell u. Norris positiv.

Die Minima sind gegenüber den für E 605 typischen mehr oder weniger in Richtung der längeren Wellen verschoben. Das ist aber relativ einfach durch Überlagerung der E 605-Kurve zu erklären (s. vorher), da schon eine ganz kleine Absorption in der Nähe dieses Minimums zu seiner Verschiebung führt. Zur Identifizierung von E 605 können somit die Minima nicht benutzt werden.

Auffällig ist ferner die kontinuierliche Größenzunahme der Maxima der Destillate I, III und V im Laufe der Zeit. Es kann sich dabei

- 1) um Spaltprodukte des E 605-Moleküls handeln, die in zunehmendem Maße frei werden, flüchtig sind und eine stärkere molekulare Absorption aufweisen müssen als E 605 selbst (vgl. geringe Menge an zugesetztem E 605). Es wurden deshalb zahlreiche Vorversuche ausgeführt, um das Verhalten der einzelnen Spaltprodukte kennenzulernen (vgl. Versuche III-VIII).

- 2) Während des Fäulnisprozesses treten (im neutralen und alkalischen Bereich) in der Muskelsuspension selbst Stoffe auf, die destillierbar sind und diese starke Absorption bewirken. Auch das mit den Maxima der Destillate III und V übereinstimmende Maximum von Destillat I könnte so eine Erklärung finden.

Es müßte sich dabei um Störstoffe handeln, die auch für den stark positiven Ausfall der Averell- und Norris-Reaktion in Filtrat V verantwortlich wären, dagegen keinen stärkeren Ausfall der Alkalikochprobe bewirken (Suspension IV dort intensiver gefärbt, auch bei den Filtraten).

Sehr viele Stoffe weisen gerade im ultravioletten Bereich eine merkliche Absorption auf, wie allein schon aus den durchgeführten Versuchen hervorgeht: p-Nitrophenol (Maximum 320 μ), Phosphorsäure (Maximum 255 μ ; die Kurve stimmt übrigens mit der von reduziertem E 605 = p-Aminophenolester überein), p-Aminophenol (Maximum 275 μ) sind nur einige davon. Rauen gibt einen wertvollen Hinweis in seinem Biochem.Taschenbuch: zahlreiche Pyrimidine, wie sie bei Fäulnisprozessen durchaus vorkommen, wie Thymin, Uracil, Cytosin, Cytidinmono-, di- und -triphosphorsäure weisen Absorptionsmaxima zwischen 262 und 287 μ auf und Minima zwischen 230 und 243 μ .

Die Störstoffe können einerseits das Maximum von E 605 völlig unterdrücken (vgl. Destillat IV), andererseits durch stärkere Konzentration dieses Maximum stark verzerren. Da die Minima aus oben angeführten Gründen für die Auswertung unbrauchbar sind, kann somit nur das mehr oder weniger verfälschte E 605-Maximum zur Diagnostik herangezogen werden.

Daraus ergibt sich fast von selbst der Schluß, daß die durchgeführte spektrophotometrische Messung nie allein den sicheren Nachweis im Organdestillat liefern kann, ebensowenig wie ihn jede einzelne der verwendeten Farbreaktionen, auf sich allein gestellt, erbringen kann.

Das Problem liegt in der Trennung der absorbierenden Störstoffe vom E 605. Versuchsweise wurde a) das Destillat von fauler Leber spektrophotometrisch gemessen, b) das Destillat einer reinen E 605-Lösung. Die errechnete Additionskurve der beiden

Destillate stimmte in ihren Charakteristika mit denen von Destillat V, I und III überein. Das umgekehrte Verfahren, das Subtraktionsverfahren, bzw. die Messung des E 605-haltigen Muskeldestillats gegen Muskeldestillat ohne E 605 als Möglichkeit zur Ausschaltung der Störstoffe, ist aber leider auch nur im Modellversuch möglich ¹⁾.

4.) Ergebnisse der Reaktion nach Averell und Norris.

Es fiel auf, daß sowohl bei den Filtraten als auch bei den Destillaten während oder nach dem Reduktionsvorgang gelegentlich Färbungen auftraten. So wurde bei Filtrat II eine leichte Gelbfärbung, bei Filtrat V eine Rosafärbung bemerkt; die Destillate wiesen gelegentlich Rosafärbungen auf, die zum Teil schon während des Erhitzens oder beim Erkalten wieder verschwanden; Destillat II blieb immer farblos. Die Ursache dieser Verfärbungen ist noch ungeklärt.

Bei Zugabe des Kupplungsreagens trat erneut Farbwechsel auf. Es zeigte sich, daß sich in manchen Lösungen die zugegebenen Tropfen des Reagens sofort intensiv weinrot färbten, ähnlich wie bei einer Titration (vgl. Versuch V), beim Umschütteln verschwand die Farbe. Dieser Vorgang wurde bei den Filtraten I, III und V beobachtet (Fäulnis!). Da Ähnliches bei reinen Lösungen nie beobachtet wurde, könnte es sich dabei um Nebenreaktionen der enthaltenen Verunreinigungen handeln.

Die Einzelergebnisse der durchgeführten Reaktionen sind in den beiden Tabellen niedergelegt.

Reduzierte Proben.

- a) Sämtliche Proben von Suspension II, sowohl die Filtrate als auch die Destillate, weisen zwar manchmal leicht gelbliche oder bräunliche Tönungen auf, zeigen aber nie einen positiven Ausfall. Offensichtlich ist diese Fehlreaktion auf die

1) Schmidt hat neuerdings diese Unsicherheit umgangen, indem er das überdestillierte E 605 weiteren Identifizierungsmaßnahmen unterzog.

Tabelle I. Reaktion nach Averell und Norris.

Ergebnis der Filtrate, reduziert.

Datum:	I	II	III	IV	V
19.8.	+ l.viol.- braun	- farblos	+ viol.- braun	+ l.viol.- braun	++ rötl.- viol.
24.8.	+ l.viol.- braun	- l.bräunl.	+ viol.- braun	+ rötl.- ll.viol.	+++ rötl.- s.viol.
27.8.	++ viol.- braun l.trüb	- gelblich	+++ s.viol.- braun	+ l.viol.	++++ rötl.- ss.viol.
30.8.	++ viol. trüb	- gelblich	+++ s.viol. trüb	+ l.viol.	++++ rötl.- ss.viol.

Ergebnis der Destillate, reduziert:

19.8.	- farblos	- farblos	+ l.viol.	++ viol.	+ l.viol.
24.8.	+ ll.viol.	- farblos	+ l.viol.	+++ s.viol.	+ l.viol.
27.8.	+ l.viol.	- gelb	++ viol.	+++ s.viol.	++ viol.
30.8.	+ l.viol.	- gelblich	++ viol.	+++ s.viol.	++ viol.
22.9.	+ l.viol.	- gelblich	++ viol.	+++ s.viol.	++ viol.

Zeichenerklärung: + = positiv
- = negativ

viol. = violett
l.viol. = leicht violett
ll.viol. = ganz leicht
 violett
rötl. = rötlich
s.viol. = stark violett
ss.viol. = sehr stark
 violett.

Tabelle II. Reaktion nach Averell und Norris.

Ergebnis der Filtrate, nicht reduziert.

Datum:	I	II	III	IV	V
19.8.	bräunl.	farbl. l.trüb	bräunl.	l.bräunl.	gelblich trüb
24.8.	bräunl.- gelb	bierbr. l.trüb	bräunl.- gelb	gelb klar	bräunl.- gelb
27.8.	bräunl.	bräunl. gelb	bierbr.	goldgelb	gelblich trüb
30.8.	bräunl.- gelb trüb	bräunl.- gelb	gelblich trüb	gelblich klar	gelb

Ergebnis der Destillate, nicht reduziert:

19.8.	farblos	l.bräunl.	farblos	farblos	bräunl.
24.8.	bräunl.- gelb	l.bräunl.	bräunl.	bräunl.	gelblich
27.8.	bräunl.	gelblich trüb	bräunl.	bräunl.- gelb	bräunl.
30.8.	s.gold- gelb	gelb trüb	gold- gelb	gelb	bräunl.
22.9.	+ bräunl. ll.viol.	bräunl.- gelb	bräunl.- gelb	l.gelbl.	bräunl.- gelb

Abkürzungen: bräunl. = bräunlich
bierbr. = bierbraun.

Gegenwart von Formalin zurückzuführen, die eine Farbbildung in jedem Fall verhindert. Die allgemein bekannte Reaktionsfreudigkeit der Aldehyde gibt Anlaß zu der Vermutung, daß das Formaldehydmolekül mit der reagierenden Gruppe des E 605-Moleküls Verbindungen eingeht, die eine Diazotierung nicht zulassen.

Für die gerichtsmedizinische Praxis ergibt sich daraus, daß formalinfixierte Asservate zum Nachweis von E 605 mittels dieser Reaktion ungeeignet sind.

- b) Die größte Farbtintensität bei den Filtraten weist eindeutig immer die Suspension V auf, dann folgen Filtrat III, I und IV.
- c) Die größte Farbtintensität bei den Destillaten dagegen tritt immer bei Suspension IV auf, dann folgen Destillat V, III und I.

Nicht reduzierte Proben.

Wie aus den Tabellen ersichtlich, bekamen wir bei den nicht reduzierten Proben allgemein uncharakteristische Verfärbungen, die von reinem Hellgelb über intensives Goldgelb bis zum Bierbraun alle Farbschattierungen aufwiesen.

Während bei den Filtraten, die ja noch eine gewisse Eigenfärbung hatten, keine Violettfärbung erkennbar war, zeigten einige Destillatproben violetten bzw. stahlblauen Einschlag. Eine eindeutige Unterscheidung zwischen Braun und Violettbraun war allerdings nicht möglich. So konnte beispielsweise bei Destillat I, III und IV vom 19.8. nach zweitägigem Stehen bei Aufsicht (größere Schichtdicke) deutlich ein violetter Schimmer wahrgenommen werden, bei Durchsicht war aber außer einer ganz leichten bräunlichen Verfärbung nichts zu sehen.

Mit Sicherheit trat eine Verfärbung bei Destillat V auf. Die uncharakteristische gelbliche bzw. bräunliche Färbung, die zunächst vorhanden war, hatte sich über Nacht in einen graublauen (nicht rotvioletten) Farbton verwandelt. Eigenartigerweise trat diese Verfärbung nicht immer deutlich auf; sie wurde erstmals sieben Tage nach Ansatz der Suspensionen beobachtet.

Auswertung.

Es scheint, daß Intensität und Art der Farbe noch von vielen unbekannten Faktoren abhängen¹⁾. Daß der p_H -Wert, wie er bei der Durchführung der Reaktion vorherrscht, die Farbindensität beeinflusst, wurde bereits in Abschn. B/Kap.I,2 erwähnt, hier spielt er keine Rolle, da alle Proben für den Reduktionsvorgang stark sauer gemacht wurden. Dagegen ist das p_H der verwendeten Muskelsuspensionen von entscheidender Bedeutung, wie die Ergebnisse zeigen²⁾. Der stark positive Ausfall der Suspension V (reduziert) ist teilweise sicher nicht auf E 605 zurückzuführen, sondern auf Abbauprodukte bei der Fäulnis (vgl. Kaiser und Haag). Dafür würde auch die Intensitätszunahme im Laufe der Zeit sprechen, obwohl diese nur mit Vorsicht bewertet werden darf. Auch scheint das Muskeleiweiß auf die Farbbildung irgendwie beeinflussend zu wirken (vgl. auch Alkalikochprobe): Probeweise wurde neutrales E 605-haltiges Filtrat mit Trichloressigsäure enteiweißt, dann erst reduziert und die Reaktion durchgeführt. Es trat eine schwach rötlich-violette Farbe auf, deren Intensität nach eintägigem Stehen scheinbar abgenommen hatte, während die stärkere Färbung des nicht enteiweißten Gegenstücks sich noch vertieft hatte³⁾. Auffällig ist ferner der positive Ausfall von Suspension I (ohne E 605-Zusatz). Wie neuerdings Kaiser und Haag feststellen, muß dabei an Tryptophan und seine Abbauprodukte gedacht werden, Indikan, Indol und Skatol, die alle eine positive Averell- und Norris-Reaktion geben, und vor allem auch an ein Hb-Abbauprodukt ("Blutnitrokörper"). Ähnliche Stoffe mögen

1) Neuerdings stellten Weinig, Schmitt und Schmidt, ferner Paulus und Mallach fest, daß u.a. auch Veronal einen positiven Ausfall der Averell- und Norris-Reaktion hervorruft. Ein Veronal-Acetatpuffer wurde der Suspension IV zugesetzt!

2) Vgl. Arbeit Post.

3) Den Gegensatz zwischen dem stark positiven Ausfall der Reaktion nach Averell und Norris bei Destillat IV und dem auffallend schwachen bei Filtrat IV muß man wohl so erklären, daß durch die Destillation eine Anreicherung der Barbiturate erfolgte.

auch für die blaugraue Verfärbung nach eintägigem Stehen bei den nicht reduzierten Proben (nachgewiesen bei Destillat V) verantwortlich sein. Dabei ist jedoch auch an freies p-Aminophenol zu denken (vgl. Versuch IV und IX).

5.) Ergebnisse der Alkalikochprobe.

Filtrate.

Die Beurteilung der Gelbfärbung bei den Filtraten ist sehr schwierig, da diese schon vor der Behandlung weder klar noch farblos waren (s.vorher). Die Farbe variierte etwas bei den einzelnen Proben, sie war meist ein schmutziges Gelbbraun. Ein positiver Ausfall der Reaktion kann daher nur aus der Zunahme der Gelbfärbung im Vergleich zum unbehandelten Filtrat erkannt werden.

Die Ergebnisse waren im einzelnen folgende:

- Suspension I: Keine Zunahme der gelblichen Färbung zu bemerken; leicht gelblicher Bodensatz.
- Suspension II: Kaum merkliche Zunahme der leicht gelblichen Färbung, Trübung.
- Suspension III: Leichte Zunahme der gelblichen Färbung. Gelblicher Bodensatz.
- Suspension IV: Gegenüber dem ursprünglichen Filtrat schwach gelblich gefärbt; keine oder nur leichte Trübung.
- Suspension V: Deutliche Zunahme der Gelbfärbung; Bodensatz.

Zur besseren Beurteilung wurden bei den späteren Wiederholungen dieser Reaktion die Filtrate mit der gleichen Menge an Trichloressigsäure enteiweißt, die Fällung abfiltriert, und mit dem jetzt völlig klaren Filtrat die Probe durchgeführt.

Ergebnis:

Die Färbung war so schwach, daß selbst im Vergleich mit Wasser bei allen Proben nur ein fraglich positiver Ausfall festgestellt und nur bei der Aufsicht (größere Schichtdicke) ein ge-

ringer gelblicher Schimmer wahrgenommen werden konnte. Dabei zeigte sich, daß der Ausfall der Probe IV meist eine Kleinigkeit intensiver war.

Destillate.

Hier war die Auswertung bedeutend einfacher. Das Destillat wies saure Reaktion auf, deshalb trat nie Gelbfärbung vor der Behandlung auf. Die durchgeführten Reaktionen zeigten übereinstimmend folgendes Ergebnis:

Suspension I: farblos

Suspension II: gelblich

Suspension III: farblos

Suspension IV: (leicht) gelblich

Suspension V: farblos bzw. fraglich positiv.

Dabei war die Intensität der Gelbfärbung des Destillats II bei den ersten Versuchen größer als bei IV, später waren die Intensitäten etwa gleich.

C. ZUSAMMENFASSUNG.

I. Ergebnis der Vorversuche.

- 1) Durch Kochen von E 605-Lösung (1/2 %ig) tritt sowohl bei saurer als auch bei neutraler Reaktion eine Hydrolyse des Moleküls ein, was beim Nachweis mittels einfacher Destillation zu beachten ist. Die Spaltung scheint jedoch auch bei längerer Kochzeit keinen größeren Umfang anzunehmen.
- 2) Bei der Destillation einer 1 o/oo igen, wässrigen Lösung von p-Aminophenol-hydrochlorid ist eine Veränderung eingetreten. Allerdings wurde im Destillat eine positive Indophenolblaureaktion erhalten, die für etwa 1/100 der vorgelegten Menge sprach.
- 3) Nach Verlauf von 5 Wochen war (durch Extraktionsverfahren) noch p-Nitrophenol in einer Muskelsuspension nachweisbar. Die Suspension enthielt 50 mg p-Nitrophenol pro Liter.
- 4) Aus dem Destillat einer wässrigen Suspension von 6 1/2 Monate alter, gefaulter Leber konnten weder p-Aminophenol, noch Nitrophenol oder andere Substanzen mit gleicher Reaktionsfähigkeit nachgewiesen werden.
- 5) Der p-Aminophenolester des E 605 einerseits und des E 600 andererseits war bei der Destillation zu einem geringen Teil flüchtig. Unter den von uns gewählten Versuchsbedingungen ging etwa 1/200 des aus E 605 gewonnenen und 1/70 des aus E 600 erhaltenen p-Aminophenolesters ins Destillat über.
- 6) Es tritt bei der Alterung verdünnter, wässriger E 605-Lösungen zwar eine Spaltung des E 605-Moleküls auf, eine Reduktion konnte von uns jedoch nicht beobachtet werden.
- 7) Durch Erhitzung (bei der Reduktions- und Destillationsmaßnahme) verwandelt oder zersetzt sich der größere Teil des vorhandenen p-Aminophenols in ein Produkt, das keinen positiven Ausfall der Reaktion nach Averell und Norris mehr aufweist.

- 8) Das Ergebnis der Reaktion nach Averell und Norris weist einen charakteristischen Unterschied auf, je nachdem ob mit dem Spaltprodukt von E 605 oder mit dem ungespaltenen Ester gearbeitet wurde. Der Unterschied kommt in der Farbe und im Zeitpunkt der Entstehung des Farbmaximums zum Ausdruck.

II. Ergebnis der Hauptversuchsreihe.

- 1) Ansätze von Muskelhomogenat in stark verdünnter, wässriger Suspension (1,66%ig), die, abgesehen vom Leerversuch, 5 Gamma E 605-Wirksubstanz pro ccm enthielten, wurden bei Zimmertemperatur der experimentellen Fäulnis überlassen. Ein Gefäß wurde mit 5% Formalinzusatz konserviert, ein weiteres sauer und ein drittes alkalisch gepuffert, während das vierte ohne weitere Zusätze blieb. Die spektrophotometrische Messung der Filtrate dieser Ansätze gegen Wasser im ultravioletten Bereich ergab durchwegs uncharakteristische Absorptionskurven, die während der Versuchszeit von fünf Wochen sich nicht nennenswert änderten.
- 2) Nach Destillation der angesäuerten Ansätze wurden dagegen bei spektrophotometrischer Messung der Filtrate gegen Wasser Absorptionskurven erhalten, die ähnliche Maxima und Minima wie die E 605-Wirksubstanz aufwiesen. Da eine deutliche Differenz zwischen dem Leerversuch und den übrigen Ansätzen nicht zu erkennen war, und zudem die Absorptionskurven mit zunehmender Versuchsdauer stärker ausgeprägt waren, ist an das Auftreten von unspezifischen Substanzen während der Fäulnis zu denken, die in das Destillat übergehen. Hierbei ist eine Ausnahme zu erwähnen: der zur Herstellung saurer Reaktion verwendete Veronal-Acetat-Puffer erwies sich nachträglich als störend für die Untersuchungen, da Veronal in das Destillat übergeht und im ultravioletten Bereich bei saurer Reaktion eine ähnliche Absorptionskurve aufweist, wie sie in Abb. II, Kurve IV dargestellt ist. Die mit Formalin versetzte Suspension ver-

änderte sich hinsichtlich des Absorptionsverhaltens ihrer Destillate kaum.

- 3) Die Reaktion nach Averell und Norris wurde mit und ohne Reduktion sowohl bei den Filtraten, als auch bei den Destillaten der einzelnen Ansätze angewandt. Dabei ergab sich zunächst, daß Formaldehydzusatz sowohl im Filtrat als auch im Destillat die Reaktion störte. Die nicht reduzierten Proben waren praktisch alle negativ bis uncharakteristisch im Farbausfall. Eine Reduktion des E 605-Wirkstoffes oder seiner Spaltprodukte konnte somit während der experimentellen Fäulnis nicht nachgewiesen werden. Da positiver Ausfall der Averell und Norris-Reaktion nach Reduktion sowohl beim Leerversuch wie auch bei den E 605-haltigen Suspensionen beobachtet wurde, und zwar Verstärkung des Reaktionsausfalls mit zunehmender Zeit, ist die Verwertung positiver Ergebnisse bei dieser Reaktion zum Nachweis von E 605 nicht möglich; es handelt sich hier lediglich um ein Gruppenreagens (Weinig).
- 4) Die Alkalikochprobe war in den Filtraten durch Leerwerte unspezifischer Beimengungen gestört, in den Destillaten wurden positive Ergebnisse bei dem angesäuerten Ansatz und bei der mit Formalin konservierten Suspension erhalten, während der E 605-freie Ansatz, sowie der neutrale und der alkalische E 605-haltige Ansatz negativ reagierte. Daraus kann eine verbesserte Haltbarkeit des E 605-Moleküls nach Formaldehydzusatz oder bei saurer Reaktion abgeleitet werden.

D. LITERATURVERZEICHNIS.

- Averell, P.R. and Norris, M.V. Estimation of Small Amounts of O,O-Diethyl-O,p-Nitrophenyl-Thiophosphat Analyt. Chem. 20, 753 (1948)
- Berg, St.O. und Maier, F. Zur Toxikologie einiger neuer Schädlingsbekämpfungsmittel Dtsch.Z.gerichtl.Med. 40, 335 (1951/52)
- Breinlich, J. Der chemische Nachweis von insektiziden Pflanzenschutzmitteln mit Nitrophenolstruktur (E 605 und ähnliche) Slg.Vergift.fälle, Arch.Toxikol. 14, 366 (1952/54)
- Derkosch, J. Zum Nachweis des Schädlingsbekämpfungsmittels E 605 Jansch, H. Monatshefte f. Chemie, 85, 684 (1954)
- Leutner, R. und Mayer, F.X.
- Diggle, W.M. and Gage, J.C. Cholinesterase Inhibition by Parathion in vivo Nature (Lond.) 168, 998 (1951)
- Dropmann, P. Nachweis des Schädlingsbekämpfungsmittels E 605 Dtsch.Med.Wschr. 77, 372 (1953)
- Duspiva, F. Zum Wirkungsmechanismus moderner synthetischer Insektizide Angew. Chem. 66, 17/18, 541 (1954)
- Eicken, S.v. Zur Ausscheidung von p-Nitrophenol im Urin nach Einwirkung von Pflanzenschutzmittel E 605 Angew.Chem. 66, 17/18, 551 (1954)
- Feigl, F. Spot Test Analysis II, Amsterdam 1954
- Fretwurst, F. und Naeve, W. Beitrag zum Nachweis des E 605 im Leichenmaterial Arch.Toxikol. 15, 185 (1955)
- Gage, J.C. The Determination of p-Nitrophenol and p-Nitrophenyl-O-S-diethyl Thiophosphat in Parathion The Analyst, 77, 912, 123 (1952)
- Hagen, I. und Reinl, W. Vergiftungen durch das neuartige Schädlingsbekämpfungsmittel E 605 f und verwandte Stoffe Münch. Med. Wschr., 92, (1950)
- Hartig, H. Dissert. im Druck, Erlangen
- Hecht, G. und Wirth, W. Zur Pharmakologie der Phosphorsäureester Arch. exper. Path. u. Pharmakol. 211, 264 (1950)

- Homann, W. Eine papierchromatographische Methode zur Messung der Cholinesteraseaktivität Arch. exper. Path. u. Pharmacol., 224, 176 (1955)
- Jantzen, G. Beitrag zur Symptomatologie der E 605-Vergiftungen des Menschen Dtsch. Med. Wschr., 76, 50, 1601, (1951)
- Kaiser, H. und Haag, Th. Zum chemisch-toxikologischen Nachweis von E 605 Bayer, sowie einiger anderer Insektizide der Thiophosphorsäurereihe Dtsch. Apotheker-Ztg. 1955, 211.
- Kaiser, H. und Lang, W. Beitrag zur qualitativen und annähernd quantitativen Bestimmung von E 605 im Blut Süddtsch.Apotheker-Ztg. 22, 394 (1953)
- Ketelaer, J.A.A.u. Hellingsman, J.E. Chemical studies on insectizides Analyt. Chem. 23, 646 (1951)
- Kohn-Abrest, M.E. Tödliche Parathion-Vergiftung Ann. Med. leg. 33, 236 (1953)
- Kortüm, G. Kolorimetrie, Photometrie und Spektrometrie. Band II, Springer-Verl., Berlin-Göttingen-Heidelberg
- Lehmann, A.J. The Major toxic Actions of Insecticides Bull. N. Y. Acad. Med. 25, p. 382
- Leonhardt, J. Tödliche Vergiftung mit Insecticid E 605 f Slg. Vergift.fälle, Arch. Toxikol., 14, 395 (1953)
- Mayer, F.X. und Luszczyk, A. Absorptions-Spektralanalyse Walter de Gruyter u.Co.,Berlin W 35 (1951)
- Metcalf, R.L. and March, R.B. Further studies on the mode of action of organic thiono-phosphate insecticides Ann. Entomol. Soc. Amer.46, 63 (1953)
- Paulus, W. und Mallach, H.J. Die mögliche Störung des Nachweises von Diäthyl-p-nitrophenylthiophosphat nach Averell und Norris durch Sulfonamide Arzneim.forschung 6, 636 (1956)
- Paulus, W. und Mallach, H.J. Das Verhalten der Barbiturate beim Nachweis des Diaethyl-p-nitrophenylthiophosphats nach Averell und Norris Arzneim.forschung 7, 72 (1957)
- Paulus, W., Mallach, H.J. und Janitzki, U. Zum Nachweis von E 605 Arzneim.forschung 5, 241 (1955)
- Pfeil, E. Über den Nachweis von E 605 Dtsch.Z. gerichtl.Med. 42, 449 (1953)
- Pfeil, E. und Goldbach, H.J. Qualitative und quantitative Bestimmung von E 605 in biologischem Material. Klin.Wschr. 31, 1011 (1953)

- Post, Hansgeorg Über Fehlerquellen bei der spektrophotometrischen Analyse zur Identifizierung von E 605
Dissertation, Institut für gerichtl. Med., Erlangen
- Pribilla, O. Vergiftungen mit E 605 (O,O-Diäthyl-O, p-nitrophenyl-thiophosphorsäureester)
Arch. f. Toxikol. 15, 210 (1954)
- Quecke, K. Das Präparat E 605
Dustri-Verlag, Remscheid-Lennep (1954)
- Rauen, H.M. Absorptionsschwerpunkte von Pyrimidinen
Biochem. Taschenbuch, Springer-Verl., S. 411
- Schönamsgruber, M. Die potentiometrische Bestimmung von O,O-Diäthyl-O-p-Nitrophenylthiophosphat (E 605) bzw. des homologen Dimethylesters des O,O-Dimethyl-O-p-Nitrophenylthiophosphats in üblichen Handelspräparaten
Z. anal. Chem. 135, 23 (1952)
- Schmidt, G. Toxikologische Erfahrungen bei E 605-Vergiftungen
Arch. Toxikol. 15, 361 (1955)
- Schrader, G. Die Entwicklung neuer Insektizide auf Grundlage organischer Fluor- und Phosphorverbindungen.
2. Aufl., Monogr. angew. Chemie, Verl. Chemie 1952
- Schwerd, W. und Schmidt, G. Einfache Schnellreaktion im Blut zum Nachweis von Vergiftungen mit dem Schädlingsbekämpfungsmittel E 605
Dtsch. Med. Wschr. 77, 372 (1952)
- Taschen, B. und Wirrigger, W. E 605 in der Praxis und im Tierversuch
Dtsch. Med. Wschr. 75, 1478 (1950)
- Völksen, W. Nachweis der E. 605-Vergiftung
Dtsch. Apotheker-Ztg. 92, 393 (1953)
- Vogel, G. Vergiftungen mit dem Insektizid E 605
Slg. Vergift.fälle, Arch. Toxikol. 14, 381 (1953)
- Vogt, H. Zur Analytik von kontaktinsektiziden Thiophosphorsäureestern (E 605, Thiophos, Parathion)
Pharm. Ztg.-Nachrichten Nr. 35, 1951
- Weinig, E. Diskuss.-Bemerkung auf der Tagung d. Dtsch. Ges. gerichtl. Med. Marburg 1956
Ref. Dtsch. Z. gerichtl. Med. 46, 269 (1957)
- Weinig, E., Schmitt, H. und Schmidt, G. Zum Beweiswert der Reaktion von Averell und Norris beim Nachweis von E 605
Arch. Toxikol. 15, 423 (1955)
- Wirth, W. Zur Pharmakologie der insektiziden Phosphorsäureester
Dtsch. Med. Wschr. 79, 1295 (1954).

E. LEBENSLAUF .

Am 13.1.1930 wurde ich, Gertraud Feiertag, als Tochter des Baurats Leonhardt Feiertag und seiner Ehefrau Albina, geb. Scheuerer, in Ammerndorf b.Nürnberg geboren.

In Nürnberg besuchte ich vier Klassen der Volksschule und trat 1940 in die Mädchenoberschule über. 1943 wurden wir ausgebombt. Ich kam nach Ingolstadt/Donau und ging bis Kriegsende dort zur Schule. Die sechste bis achte Klasse absolvierte ich wieder in Nürnberg, und im Juli 1949 bestand ich dort die Reifeprüfung der jetzigen Oberrealschule für Mädchen.

Vor Beginn meines Studiums um Herbst 1950 arbeitete ich, um mir etwas Geld zu verdienen. Zunächst war ich als stud.biol. eingeschrieben, wandte mich aber nach einem Semester dem Studium der Medizin zu. Im Frühjahr 1953 unterzog ich mich der ärztlichen Vorprüfung an der Universität Erlangen. Die übrigen Semester verbrachte ich in München und Erlangen, wo ich im Herbst 1956 das Staatsexamen ablegte.

In der folgenden Zeit führte ich meine Dissertation im Institut für gerichtliche Medizin zu Ende; seit Mai bin ich in der Universitätsfrauenklinik tätig.

An dieser Stelle möchte ich nicht versäumen, Herrn Professor Dr.Dr. E. W e i n i g für die Überlassung des Themas und Herrn Dr. G. S c h m i d t für die Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit herzlich zu danken. Herrn Dr. Lautenbach und Herrn Opitz danke ich für die Hilfe bei der Herstellung der Kurven.

